Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Abteilung für Naturwissenschaftliche Medizin
der Ruhr-Universität Bochum

ZUM EINFLUSS VON METHYLENDIOXYAMPHETAMIN AUF DIE AKTIVITÄT DER DOPAMIN-β-HYDROXYLASE UND DER CATECHOL-O-METHYLTRANSFERASE BEI MÄUSEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der
Abteilung für Naturwissenschaftliche Medizin
an der Ruhr-Universität Bochum

von
SIGRID LÜBS

Bochum 1982 ~~1983~~

UNIV.
LEIDEN
LIBR.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549226_0005

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Abteilung für Naturwissenschaftliche Medizin
der Ruhr - Universität Bochum

Zum Einfluß von Methylendioxyamphetamin auf die Aktivität der Dopamin - ß - Hydroxylase und der Catechol - O - Methyltransferase bei Mäusen

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der
Abteilung für Naturwissenschaftliche Medizin
an der Ruhr - Universität Bochum

von
Sigrid Lübs
Bochum 1982

	Inhalt	Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Einführung in MDA	2
1.1.1	Klassifikation	2
1.1.2	Pharmakologie	2
1.1.3	Psychotrope Effekte	5
1.1.4	Anwendungsformen und Komplikationen	5
1.1.5	Toxizität	6
1.2	Arbeitshypothesen und Untersuchungskonzept	8
2.	Ermittlung einer MDA - Dosis für das chronische Experiment	1o
2.1	Methoden	1o
2.2	Physiologische Veränderungen	1o
2.3	Verhaltensänderungen	14
2.4	Schlußfolgerungen	16
3.	Ermittlung der Enzymaktivitäten im chronischen Experiment	17
3.1	Materialien und Methoden	17
3.1.1	Versuchstiere	17
3.1.2	Substanzen	18
3.1.3	Radioaktive Substanzen	19
3.1.4	Pufferlösungen	2o
3.1.5	Scintillationscocktail und - zähler	2o
3.1.6	Gewinnung der Gehirne	21
3.1.7	Homogenisierung des Hirngewebes	21
3.1.8	Proteinbestimmung	21
3.2	Die Enzyme der Catecholamin - Biosynthese und des Catecholamin - Katabolismus	22

		Seite
3.3	Messung der Enzymaktivität	25
3.3.1	Messung der DBH - Aktivität	25
3.3.2	Messung der COMT - Aktivität	31
4	Resultate	36
4.1	Tabellarische Zusammenstellung der Meßergebnisse	39
4.2	Auswertung der Meßergebnisse	5o
4.2.1	DBH - Aktivität	5o
4.2.2	COMT - Aktivität	54
5.	Diskussion	57
6.	Zusammenfassung	6o
7.	Literatur	61

Abkürzungen :

MDA	Methylendioxyamphetamin JUPAC*
COMT	Catechol - O - Methyl - Transferase
DBH	Dopamin - ß - Hydroxylase
SAM	S - Adenosyl - Methionin
PP	Phosphat - Puffer
KPP	Kalium - Phosphat - Puffer
EMI	N - Ethylmaleïmid
DA	Dopamin
NA	Noradrenalin
α - MeDA	α - Methyldopamin

* 1,3 Benzodioxole - 5 - ethanamine - α - methyl

1. Einleitung

Das Spektrum von Drogen mit aktivierendem oder dämpfendem Effekt auf das zentrale Nervensystem ist in ständiger Erweiterung begriffen. Innerhalb der Gruppe der Amphetaminabkömmlinge findet 3,4-Methylendioxyamphetamin (MDA; Slang: " Love drug;" " mellow drug of America ") große Verbreitung [14][11]. Wenn auch im Verhältnis zur Beliebtheit der Droge und Häufigkeit der Anwendung nur einzelne Fälle mit letalem Ausgang bekannt geworden sind [25] , so liegen doch wenige Informationen über die genaue Wirkungsweise, mögliche Folgen oder Gefahren von MDA vor.

1.1 Einführung in Methylendioxyamphetamin

1.1.1 Klassifikation

Methylendioxyamphetamin (MDA) wurde 1910 von MANNICH u. JACOBSOHN synthetisiert [16]. Durch Addition unterschiedlicher Gruppen an den Phenylring des Amphetamins entstanden mehrere Drogen mit verschieden ausgeprägter psychotroper Wirkung, darunter MDA, 2,5 - Dimethoxy - 4 - methylamphetamin (DOM, STP), 3 - Methoxy - 4,5 methylendioxyamphetamin (MMDA) und 3,4,5 - Trimethoxyamphetamin (TMA). Bezüglich MDA besteht eine chemische Verwandschaft sowohl zu Amphetamin als auch zu Meskalin [29]. Obwohl MDA dem Amphetamin strukturell und in einigen Wirkungen wie Wahrung der Selbstbeherrschung, Gewichtsabnahme und Mydriasis eng verwandt ist, ist es jedoch kaum eine amphetaminähnliche Droge, werden doch andererseits durch MDA psychotrope Effekte hervorgerufen, die zu weiter Verbreitung und Mißbrauch geführt haben, und die eher LSD-ähnlich zu nennen sind. Da aber diese LSD-ähnliche, psychotrope Komponente nicht durch den LSD- Antagonisten Cyproheptadin geblockt werden kann, liegt es nahe, MDA als eigenständige Droge zu klassifizieren [28].

1.1.2 Pharmakologie

Die erste größere Studie über die Pharmakologie von MDA an Versuchstieren legten GUNN et al. 1939 vor [10]. Die beschreiben sympathomimetische Effekte wie Blutdruckanstieg und cardiale Stimulation, sowie amphetaminähnliche Wirkungen auf Teile glatter Muskulatur (Verminderung des Tonus der glatten Muskulatur in den Bronchien). Versuche, MDA als Appetitzügler bei Patienten einzusetzen, scheiterten

anfänglich an der zu hohen eingesetzten Dosis von 12o mg/Tag, bei der lediglich als unangenehm empfundene, zentral-nervöse Symptome auftraten [29]. TUREK et al. konnten später das gewünschte Resultat mit einer Dosis von 75 mg/Tag erreichen [32], als Präparat gelangte MDA jedoch nicht in den Handel.

Weitere pharmakologische Forschungen ergaben, daß MDA die Tyramin- induzierte Senkung der Gehirnatmung rückgängig macht [15]. Hinweise auf die Wirkung von MDA erbrachten auch FELLOWS und BERNHEIM [7] mit ihrer Feststellung, daß die zentrale Aktivität mit einer Hemmung der Monoamin - Oxidase (MAO) korreliert, während in späteren Studien von BAKER et al. gezeigt werden konnte, daß die MAO - Inhibition durch d- Amphetamin und MDA eine vergleichsweise kleine Rolle bei der ZNS - Stimulation spielt [4]. GOLDSTEIN und CONTRERA vermuteten einen zusätzlichen Effekt durch die Hemmung der Dopamin - ß - Hydroxylase (DBH) [9]. Der schnelle Eintritt der zentralen Stimulation läßt jedoch vermuten, daß die DBH- Inhibition lediglich an den späteren Effekten von MDA beteiligt sein kann, nicht jedoch an den akut einsetzenden Symptomen [3o]. Anhand früherer Arbeiten lag die Annahme nahe, daß Amphetaminabkömmlinge, u.a. MDA, auf zwei Wegen ihre Wirkungen entfalten, einmal durch einen direkten Effekt auf die Neurotransmitterrezeptoren, zum anderen indirekt über die Freisetzung von Katecholaminen [6], [33].

Neuere Studien hingegen zeigten auf, daß MDA und PMA (para - Methoxyphenylisopropylamin) nicht wie andere Psychotomimetica als präsynaptische Serotonin -

Agonisten wirken [22], sondern als indirekte Sympathomimetika einzuordnen sind [21] ,[23], also Noradrenalin aus den Speichervesikeln freisetzen und die neuronale Wiederaufnahme von Noradrenalin hemmen [17] .

Untersuchungen über den Metabolismus führten MARQUARDT et al. 1977 an Ratten durch [18] . Radioaktiv markiertes ^{3}H - MDA wurde intraperitoneal verabreicht und danach im Gehirn und Urin gemessen. Die Ergebnisse zeigten, daß α - Methyldopamin und / oder seine Derivate (3 - O - Methyl - α - Methyldopamin und sein Glucuronid) die wichtigsten Metaboliten in vivo sind.

Im Gehirn stellte unmetabolisiertes MDA in der ersten Stunde nahezu 1oo % der gemessenen Radioaktivität dar, danach überwog freies α - Methyldopamin (α - MeDA). Das zeitliche Zusammentreffen von höchsten α - Methyldopamingehalt und den am wenigsten amphetamin - ähnlichen Verhaltensweisen (verminderte Reaktion auf äußere Reize, herabgesetzte motorische Aktivität und ausgeprägte Müdigkeit) läßt vermuten, daß α - MeDA im Gehirn für die Wirkungen von MDA verantwortlich ist.

Hinsichtlich der Konfiguration lassen sich den optischen Isomeren unterschiedliche Wirkungsbereiche zuordnen: (R) - MDA erwies sich als das stark psychotrope Isomer, während (S) - MDA hauptsächlich sympathomimetisch wirkt, aber auch die toxischen Nebeneffekte hervorruft [17] , [2] .

1.1.3 Psychotrope Effekte

Schon 1930 wurde MDA von G. ALLES im Selbstversuch mit kleinen oralen Dosen von 10 - 120 mg getestet [1]. Erst mit der höchsten Dosis bemerkte er Veränderungen in der Wahrnehmung. Als subjektive Effekte sind im weiteren beschrieben: körperliches Wohlbefinden, erhöhte taktile Sensibilität, sowie ein starkes Bedürfnis, anderen Personen nahe zu sein. Im Gegensatz zu LSD - Erfahrungen ist der Wunsch, sein Ego zu verteidigen, sehr gering [29]. Als unangenehme Nebenwirkungen werden häufig Spannungen der Nackenmuskulatur und Zähneknirschen beschrieben [29].

Einen klinisch kontrollierten Versuch mit acht freiwilligen VPn führte NARANJO 1967 durch. Nach Einnahme von 40 - 150 mg MDA in mehreren Sitzungen gaben die VPn an, weder Halluzinationen noch Wahrnehmungsverschiebungen erlebt zu haben. Jedoch wurde über eine Intensivierung der Gefühle, der Selbstwahrnehmung und - einsicht, sowie über gesteigerte Emphatie und ästhetische Genußfähigkeit berichtet. Als einziges körperlich erfaßbares Symptom trat eine leichte Mydriasis auf. Aufgrund der Ergebnisse, v.a. der gesteigerten verbalen Kommunikationsfähigkeit der VPn, vermutet NARANJO eine Erleichterung von Psychotherapien unter Einwirkung von MDA, weist jedoch auch auf die Notwendigkeit ständiger therapeutischer Betreuung während einer Sitzung hin, sowie auf die Gefahren eventuell auftretender Amnesie [20].

1.1.4 Anwendungsformen und Komplikationen

MDA wird illegal produziert, in Pulver- oder Tablettenform vertrieben und oral, intranasal oder intravenös aufgenommen [27]. Die Wirkung setzt etwa 30 min nach der Aufnahme ein und hält ca 8 - 12 Std. an. Die gebräuchliche

Dosis liegt bei 15o - 2oo mg [29]. Bei Einnahmen von höheren Dosen, sowie bei Kombination mit anderen Drogen sind Komplikationen bis zu Fällen mit letalem Ausgang beschrieben [14], [25], [19], [8]. RICHARDS und BORGSTEDT berichten über drei andere Fälle mit paradoxer Reaktion auf MDA, wobei nach Aufnahme von 5oo mg reinem MDA starke Vergiftungssymptome auftraten, die zu akut lebensbedrohlichen Zuständen führten. Kurzzeitig nach der Aufnahme, in einem Fall nach 15 min, kam es zu tonisch-klonischen Krämpfen, Bewußtlosigkeit, gesteigerter Diaphorese, generalisierter Piloerektion, sowie Blutdruck und Temperaturanstieg. An Augensymptomen waren erst ein horizontaler Nystagmus, dann maximal dilatierte und fixierte Pupillen vorhanden. In zwei von drei Fällen kam es zu einem ausgeprägten Opisthotonus, maximaler Streckstellung der Extremitäten und Risus sardonicus. Der neurologische Status ergab symmetrische Hyperreflexie mit Klonus. Nur nach Gabe von Diazepam, bzw. Tubocurarin war eine künstliche Beatmung möglich. Nach 24 Std, bzw. 6 Stunden und 4 Stunden zeigten die Patienten einen unauffälligen Neurostatus und konnten aus klinischer Überwachung entlassen werden [26].

1.1.5 Toxizität

Über die Toxizität von MDA bei Versuchstieren liegen unterschiedliche Angaben vor. Die ersten Studien hierzu wurden bereits 1939 von GUNN et al durchgeführt. Sie ergaben eine minimale letale Dosis bei Mäusen von 12o mg/kg i.p. [1o]. 1971 fanden RICHARDS und BORGSTEDT [26] eine LD_{5o} von 75 mg/kg i.p. ebenfalls an Mäusen. Eine umfassende Studie, die auch die gebräuchliche orale und intravenöse Applikation

mitberücksichtigt, legten 1973 THIESSEN u. COOK vor. Im Toxizitätsvergleich von MDA und Amphetamin erwies sich MDA mit einer LD_{50} von 9o mg/kg i.p. als toxischer (Amphetamin: 12o mg/kg i.p.) [31].

1.2. Arbeitshypothesen und Untersuchungskonzept

Nach den bisher vorliegenden Ergebnissen scheint MDA sei
Wirkung über eine Beeinflussung des catecholaminergen, i
besondere des noradrenergen Systems auszuüben. Aus der p
tenten kompetitiven Inhibition der Wiederaufnahme von No
adrenalin in die präsynaptischen Nervenendigungen durch
MDA darf geschlossen werden, daß eine Langzeitbehandlung
mit MDA zu einer Erschöpfung der NA - Reserven führen ka

Deshalb lag es nahe, die Aktivität des Enzyms, das die U
wandlung von Dopamin zu Noradrenalin katalysiert, der LB
unter MDA - Einwirkung zu untersuchen.

Folgende Möglichkeiten wurden in Betracht gezogen:

Veränderungen der vorhandenen
Enzymmenge durch

1. Neusynthese
2. Abbau

Da sich die Konzentration von Noradrenalin während der Zu
fuhr von MDA im synaptischen Spalt erhöht, wurde weiterhi
vermutet, daß

3. die Aktivität des i.W. extraneural lokalisierten, für den Katabolismus von NA verantwortlichen Enzyms, der Catechol - O - Methyl - Transferase, ansteigt.

Es wurden deshalb die Aktivitäten der beiden o.g. Enzyme,
der DBH und der COMT, an Versuchstieren über einen Zeit-
raum von 2 Wochen bei täglicher Zufuhr von MDA gemessen,
sowie nach einer Erholungspause von einer weiteren Woche,
um eventuell auftretende Veränderungen gegenüber unbehan-

delten Versuchstieren zu erfassen.

In Bezug auf die Gesamtlebensdauer einer Maus ist die tägliche Injektion über den gewählten Zeitraum von 14 Tagen als chronisches Experiment anzusehen.

2. Ermittlung der MDA - Dosis für das chronische Experiment

Die Angaben zur Toxizität von MDA streuen von 75 - 12o mg/kg (s.o.) und wurden an unterschiedlich großen Gruppen von Versuchstieren getestet [17], [26], [31].

Für das chronische Experiment war es notwendig, eine Dosis zu ermitteln, bei der die Versuchstiere einem deutlichen MDA - Einfluß ausgesetzt waren, andererseits sollten die Verluste durch toxische MDA - Effekte minimal gehalten werden.

2.1. Methoden

Physiologische Veränderungen sowie qualitative Verhaltensänderungen wurden an weißen HAN - NMRI - Mäusen mit dem Gewicht von 3o g $\pm$ 2 g beobachtet.

Jede untersuchte Gruppe bestand aus einer homogenen Population von zehn männlichen Mäusen, um Abweichungen durch geschlechtsspezifische Hormonschwankungen auszuschließen. Die Mäuse hatten jederzeit freien Zugang zu Wasser und Futter. Im ersten Teil der Untersuchung wurden die VT in einem 25 x 4o cm großen Käfig gemeinsam beobachtet, um Eindrücke über das Verhalten im Kollektiv zu gewinnen, im zweiten Teil wurden die VT nach der Applikation von MDA in Einzelkäfige gesetzt. MDA wurde als Lösung in aqua bid. (bzw. o,9 % NaCl) intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Beobachtet wurden die VT vom Zeitpunkt der Injektion an bis zu 6 Std.danach, die Mortalität wurde nach jeweils 4 und 24 Std. festgestellt.

2.2. Physiologische Veränderungen

5 - 1o min nach der Injektion von MDA traten bei jeder verabreichten Dosis starke Schweißabsonderungen, Speichelproduktion und Piloerektion auf. Dosen von 47 mg/kg und höher

riefen Tremor des ganzen Körpers hervor, sowie Erhöhung der Atmungs- und Herzfrequenz. Diese Symptome hielten bis zu 4 Std. nach Zufuhr der Droge an.

Klonische Krämpfe traten ab 23 mg/kg auf und wurden bei höheren Dosen anhaltender und heftiger. Die Versuchstiere, die innerhalb der ersten 4 Std. ad exitum kamen, starben in klonischen Krämpfen in Rückenlage, vermutlich im Kreislaufversagen. Es fiel auf, daß einige Versuchstiere jeder Gruppe die nächsten 24 Std nicht überlebten, obwohl sie sich von den akuten Effekten scheinbar erholt hatten [s.Tab. 1].

Tabelle 1

MDA - Toxizität

gelöst in	Anzahl VT	MDA mg/kg	Ex.Let. n.4 Std.	Ex.Let. n.24 Std.	Ex.Le insge
o,9%NaCl	1o	17	1	2	3
H_2O bid.	1o*	17	-	-	-
"	1o	23	1	3	4
"	1o	33	-	6	6
"	1o	33	-	6	6**
"	1o	4o	1	1	2
"	1o	47	1	2	3
"	1o	53	2	2	4
"	1o	6o	1	3	4
"	1o	67	1	8	9
"	1o	73	3	2	5

* Die VT dieser Gruppe wurden nach der Injektion v
MDA in Einzelkäfige gesetzt

** Wiederholung

Tabelle 2

Aufgetretene Verhaltensweisen in Abhängigkeit von der MDA - Dosis [mg/kg]

Verhaltensweise	2o	4o	6o	7o	7o
Nahrungsaufnahme	-	-	-	-	-
motor. Akt.	+	+	+	+	+
klon. Krämpfe	-	+	+	++	++
Stereotypien	-	+	+	+	-
Eichhörnchenpose	-	-	+	+	+
Reaktion auf Geräusche	+	+	-	-	-
2-4 Std. p.i. Apathie	-	-	+	+	+

Merkmal ist : - nicht vorhanden

+ vorhanden

++ stark ausgeprägt vorhanden

2.3. Verhaltensänderungen

Änderungen im Verhalten der VT wurden rein qualitativ erfaßt und beschrieben [s.Tab. 2].

Kein VT nahm während der ersten 6 Std. p.i. Futter oder Wa
ser auf. Die gesteigerte motorische Aktivität äußerte sich
in Form von vermehrtem Klettern, Hüpfen sowie Laufen in he
tischen Bewegungen und dauerte bis zu 4 Std. an, gefolgt v
einer Erschöpfungsphase, bei der die VT apathisch an einer
Stelle verharrten, bis hin zu komatösen Zuständen. Reaktion
auf Geräusche, die in der Nähe des Käfigs ausgelöst wurde
zeigten die VT nur bei Dosen bis zu 4o mg/kg.

Bei mittlerer Dosierung (2o - 6o mg/kg) traten bei allen
stereotype Verhaltensweisen auf, die darin bestanden, daß
VT sich bei Zusammentreffen der Laufrichtung voreinander a
richteten und sich gegenseitig für kurze Zeit an den Pfote
berührten. In einem anderen Verhaltensmuster verharrten di
Mäuse auf der Stelle und rieben sich mit den Pfoten die Na
" hand - and - face - washing " THIESSEN u. COOK [Abb. 1]
Besonders auffällig war eine häufig eingenommene Körperhal
tung, die am ehesten mit " Eichhörnchenpose " zu beschreib
ist [s. Abb. 2].

Wurden die VT nach der Injektion von MDA in Einzelkäfige g
setzt, so zeigten sie lediglich eine geringe Steigerung de
motorischen Aktivität, jedoch dieselben physiologischen Re
aktionen wie im Sammelkäfig.

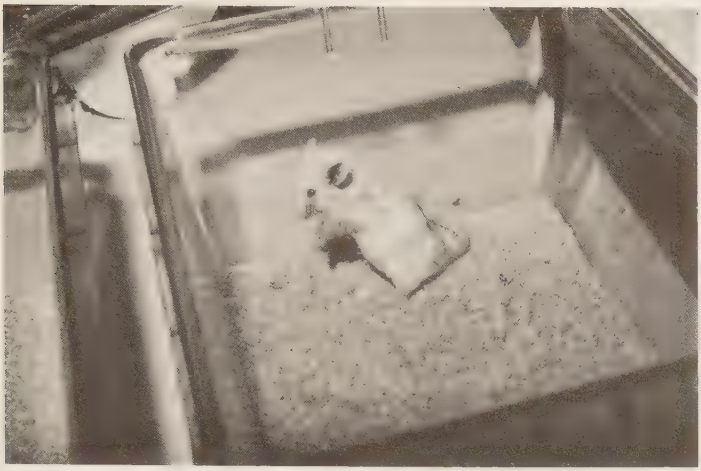


Abb. 1 Stereotypie bei mittlerer Dosierung;
" hand - and - face - washing "

Abb. 2 Eichhörnchenpose

2.4. Schlußfolgerungen

1. Es erscheint sinnvoll, die VT nach der Injektion in Einzelkäfige zu setzen, weil sie einzeln nicht oder selten in hochgradige Erregungszustände geraten.

2. Für das chron. Experiment wird die Lösung von MDA in aqua bid. vorgezogen, weil MDA in o,9 % NaCl gelöst eine höhere Mortalität zur Folge hatte, was jedoch nicht weiter untersucht wurde.

3. Die Werte der LD_{50} entsprechen im Wesentlichen denen von RICHARDS u. BORGSTEDT [26] sowie MARQUARDT et al. [17] jedoch läßt sich feststellen, daß

- in allen Gruppen, die eine Dosis von 2o - 7o mg/kg Körpergewicht erhielten, die 24 - Std - Toxizität höher lag als die akute Toxizität in den ersten 4 Std. p.i.
- es zwei Gipfel bei der Häufigkeitsverteilung der Mortalität von MDA gibt. Sowohl bei 33 mg/kg findet sich eine deutlich erhöhte Mortalität, als auch bei einer Dosis von 7o mg/kg KG.

Dieser Beobachtung wurde im Rahmen der Untersuchung nicht weiter nachgegangen.

Die oben diskutierten Punkte führten zu einer MDA - Dosis von 17 mg/kg i.p., gelöst in aqua bid., für das chronische Experiment.

3. Ermittlung der Enzymaktivitäten im chronischen Experiment

3.1 Materialien und Methoden

3.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden weiße Mäuse aus der Züchtung HAN - NMRI vom " Zentralinstitut für Versuchstiere in Hannover " eingesetzt. Das Gewicht betrug 3o g $\pm$ 2 g. Aus methodischen Gründen bestand jede Gruppe aus 6 Versuchstieren, wobei es sich ausschließlich um männliche Tiere handelte, um Abweichungen durch geschlechtsspezifische Hormonschwankungen zu vermeiden. Die Haltung der Mäuse erfolgte in Einzelkäfigen und sie hatten jederzeit freien Zugang zu Futter und Wasser. Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurde täglich zum selben Zeitpunkt MDA als Lösung in aqua bid. verabreicht.

3.1.2 Verwendete Substanzen:

MDA	synthetisiert von Dr. M. Binder
COMT	Sigma
SAM	Sigma
Adrenalin	Sigma
^{3}H - Adrenalin	New England Nuclear
DBH	Sigma
Tyramin	Sigma
^{14}C - Tyramin	New England Nuclear
Pargylin	Sigma
EMI	Sigma
Meta-Phosphorsäure	Merck
Katalase	Boehringer

3.1.3 Radioaktive Substanzen

[^{3}H] - Adrenalin

Die spezifische Aktivität des verwendeten [^{3}H] - Adrenalin betrug 8,066 Ci/mmol. Als Stammlösung wurden 5,7 µg [^{3}H] - Adrenalin und o,1 mg Adrenalin ad 1o ml HCl $1o^{-3}$ mol/l gelöst. Von dieser Lösung wurden pro Ansatz 1oµl ≙ 1,oo57 µg Adrenalin verwendet, entsprechend 5,489 nmol. Pro Versuch wurden 22o ooo cpm eingesetzt.

[^{14}C] - Tyramin

Die spezifische Aktivität des eingesetzten [^{14}C] - Tyramins betrug 58,76 mCi/mmol. Die Stammlösung bestand aus o,12 mg in o,5 ml, entsprechend o,o5 mCi. Pro Versuch wurden 25o ooo cpm eingesetzt. Die Gesamtkonzentration von Tyramin pro Ansatz betrug o,1 mol/l, wobei die Substratsättigung durch das nicht - radioaktiv - markierte Tyramin erreicht wurde, während [^{14}C] - Tyramin einen geringen Anteil einnahm.

3.1.4 Liste der verwendeten Pufferlösungen:

Puffer A : 5 mmol/l Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,o
o,2 % Triton - x - 1oo

Puffer B : 14o mmol/l Phosphat-Puffer, pH 7,8

Puffer C : o,5 mol/l Borat-Puffer, pH 1o,o

Puffer D : 1 mol/l Natrium-Acetat-Puffer, pH 5,5

3.1.5 Scintillations - Cocktail u.- Zähler

5 g PPO
2,5 g Diphenyloxazol
o,5 g bis - MSB (p- bis(-o-Methylstyryl)- Benzol)
in 1 l Toluol

Scintillations - Zähler:

Packard Tri - carb
Liquid - Scintillation Spectrometer 245o

3.1.6 Gewinnung der Hirne

Die Ausführung aller Arbeitsgänge erfolgte möglichst schnell, um einen postmortalen proteolytischen Abbau der Enzyme zu vermeiden.

Durch Fraktur der Halswirbelsäule wurde der Tod der Maus herbeigeführt.

Es folgte die Dekapitation und Eröffnung der Schädeldecke entlang der Sagittalnaht. Das Gehirn wurde durch Abtragung der Schädelknochen und der Dura mater freigelegt, samt Medulla oblongata entnommen und in o,9 % iger NaCl-Lösung gewaschen,3 sec auf Filterpapier getrocknet, gewogen und auf Eis gelagert.

Die folgenden Arbeitsgänge fanden bei einer Temperatur von 0° C bis - 4° C statt.

3.1.7 Homogenisierung des Hirngewebes modifiziert nach JOH, ROSS u.REIS [13]

Das gereinigte und gewogene Gehirn wurde mit 2,o ml Puffer A versetzt und mit einem Homogenisator nach POTTER-ELVEJHEN (clearance o,125 mm) mit 6 Hüben bei Stärke 3 homogenisiert.

Das Homogenat wurde mit 1,o ml Puffer A in ein Zentrifugenglas überführt und 15 min bei 3o ooo x g bei 5° C zentrifugiert.

Zur weiteren Verarbeitung in den Aktivitätstests wurden jeweils 25 µl (bzw. 5o µl) des Überstandes benutzt.

3.1.8 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der einzelnen Hirnproben wurde nach der BIURET - Methode [5] bestimmt. Als Standard für die Eichkurve diente eine Lösung aus Rinderserumalbumin.

3.2 Die Enzyme der Catecholamin - Biosynthese und des Catecholamin - Katabolismus

Die Transmitter des sympathischen Nervensystems, Dopamin (DA), Noradrenalin (NA) und Adrenalin kommen in besonders hoher Konzentration im Stammhirnbereich und im Hypothalamus vor. Ausgangspunkt für die Synthese dieser biogenen Amine ist die Aminosäure Tyrosin. Diese wird vom Nervengewebe aktiv aus dem Blut aufgenommen und durch Hydroxylierungs- und Decarboxylierungsreaktionen in die Transmitter überführt. An der Synthese von Noradrenalin aus Tyrosin sind drei Enzyme beteiligt, die in den Perikar der betreffenden Neurone synthetisiert werden. [24]

1. Tyrosin-Hydroxylase (Tyrosin - 3 - Monooxygenase, E C: 1.14.16.2) führt eine Hydroxylgrupp in 3-Stellung in den aromatischen Ring ein, es entsteht 3,4 Dihydroxyphenylalamin (DOPA). Als Cofaktoren werden Fe^{2+} und reduziertes Biopterin benötigt.

2. Dopa - Decarboxylase wandelt mit Hilfe des Cofakt Pyridoxalphosphat DOPA in Dopamin (3,4-Dihydroxy phenylethylamin) um.

3. Dopamin -ß- Hydroxylase (Dopamin - ß - Monooxygenase; EC : 1.14.17.1) führt durch Hydroxylieru zur Bildung von Noradrenalin aus Dopamin, wobei molekularer Sauerstoff und Ascorbat benötigt werd Dopamin - ß - Hydroxylase (DBH) findet sich aus schließlich in den noradrenergen Neuronen des peripheren und zentralen Nervensystems. Im Gegens zur Tyrosin - 3 - Hydroxylase und Dopadecarboxyl

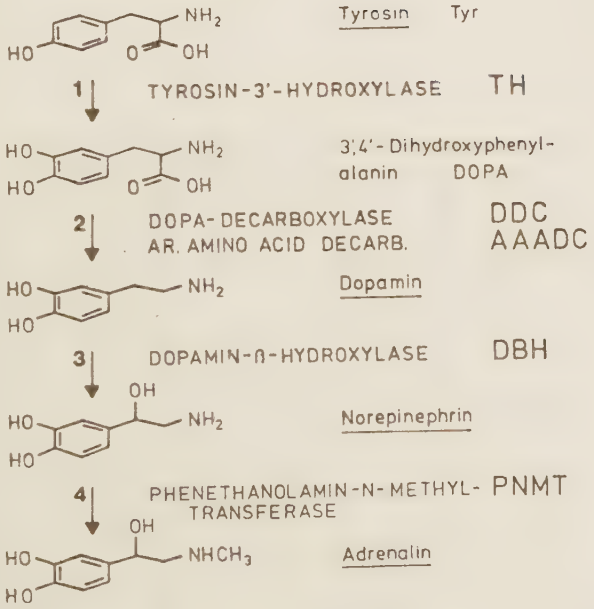
ist die DBH nicht im Zytoplasma der Neurone lokalisiert. Etwa die Hälfte ist an die Membranen der Speichervesikel des Noradrenalins gebunden, während sich die andere Hälfte in löslicher Form innerhalb dieser Vesikel befindet. Dieser Syntheseschritt erfolgt somit in den Vesikeln [12].

Die Wirkungsbeendigung von NA geschieht zu einem großen Teil durch Wiederaufnahme des Transmitters (re - uptake) in die Nervenendigung über die präsynaptische Membran. Intraneuronal wird ein geringer Teil des Noradrenalins von der Monoamin - oxidase (MAO; Amin - Oxidase) durch Desaminierung inaktiviert. Extraneuronal methyliert die Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT, Catechol-Methyl - Transferase; E C: 2.1.1.6) die phenolische Hydroxylgruppe in 3 - Stellung [s. Abb.3].

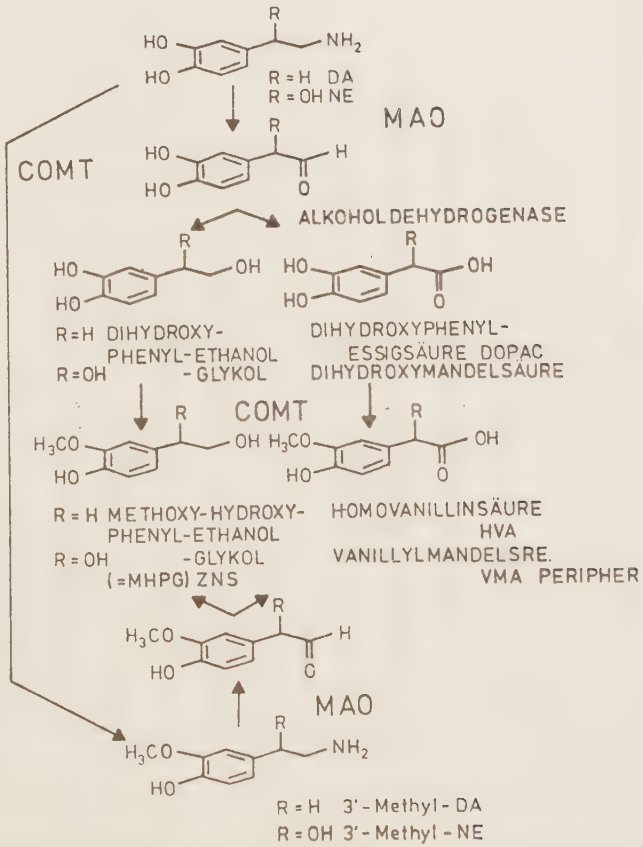
CATECHOLAMINE : BIOGENESE

Abb.3

FORMEL-SCHEMA



CA : KATABOLISMUS

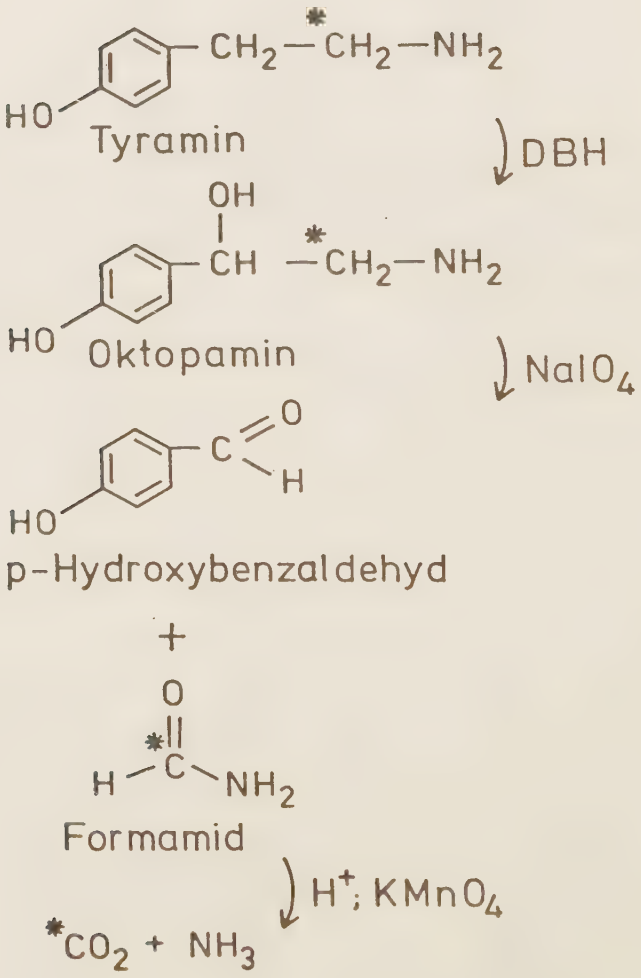


3.3 Messung der Enzymaktivität

3.3.1 Messung der DBH - Aktivität modifiziert nach JOH, ROSS u. REIS [13]

Die Aktivität der DBH wurde gemessen durch die Umwandlung von 1 - [^{14}C] - Tyramin zu 1-[^{14}C] - Octopamin, welches unter Zugabe von Natriumperiodat gespalten wurde in p - Hydroxybenzaldehyd und [^{14}C] - Formamid. Die Oxidation des [^{14}C] - Formamids durch Kaliumpermanganat lieferte [$^{14}CO_2$], das in einer Base (tissue solubilizer) aufgefangen und gemessen wurde. [s. Abb. 4]

Abb.4 Verfahren zur Aktivitätsmessung der DBH



*radioaktiv markiertes ^{14}C

Es wurde bei maximaler Substratsättigung gearbeitet. Um den Einfluß endogener Inhibitoren zu blockieren, wurde der Reaktion N - Ethylmaleïmid (EMI) hinzugefügt.

Verfahren:

Zu 5o µl Überstand der homogenisierten und zentrifugierten Probe wurden 55 µl der folgenden Reaktionsmischung hinzugegeben:

5 µl Ascorbat (12o mmol/l)
1o µl Fumarat (22o mmol/l)
5 µl Pargyline (2o mmol/l)
5 µl EMI (1o mmol/l)
1o µl Puffer D
1o µl Katalase (15oo U)
5 µl Tyramin ($1o^{-1}$ mol/l)
5 µl 1 - $[^{14}C]$ - Tyramin (25o ooo cpm)

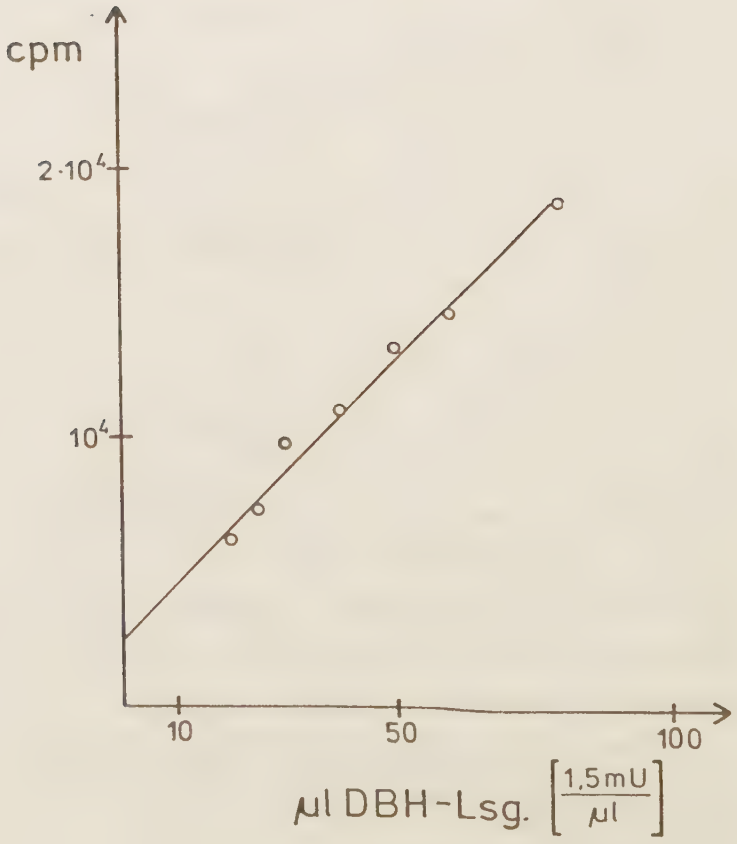
Diese Reaktionsmischung wurde 3o min bei 37° C im Schüttelbad inkubiert, mit 5o µl 2o %iger Metaphosphorsäure gestoppt, für 1o min auf Eis gestellt und dann 15 min mit 6ooo x g zentrifugiert. 1oo µl des Überstandes wurden mit 25 µl 2 mol/l NaOH und 1oo µl o,1 % Natriumperiodat in die Bodenfläche eines Warburg - Gefäßes gegeben und dieses rasch verschlossen. Die Mischung blieb 6o min bei Raumtemperatur stehen und wurde in Abständen von 15 min geschwenkt. Nach Gabe von 1oo µl 4 mol/l HCL in die Bodenfläche und 2oo µl tissue solubilizer in das Mittelgefäß wurden 1oo µl o,5 % Kaliumpermanganatlösung in die Bodenfläche gegeben und das Gefäß umgehend verschlossen. Der gesamte Inhalt des Mittelgefäßes wurde nach 2 Std. Inkubation im Schüttelbad bei 37° C im Flüssig-Scintillationszähler gemessen.

Zur Eichung des Tests wurde DBH der Fa. SIGMA verwendet, wobei zwischen 2o und 8o µl DBH - Lösung (= $\frac{1,5\ mU}{\mu l}$) eingesetzt wurden.

Nach Messung des Proteingehalts im Homogenat wurde die Aktivität in $\frac{cpm}{mg\ Protein}$ umgerechnet.

Anhand der Eichkurve (s. Abb. 5) wurden die DBH - Werte der einzelnen Gewebeproben ermittelt.

Abb. 5 Eichkurve für die DBH - Aktivität

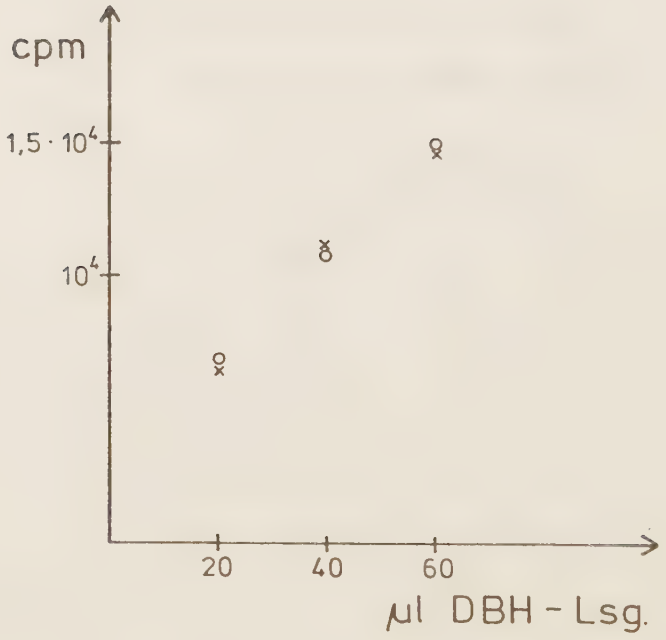


In einem Kontrollversuch konnte weiterhin gezeigt werden, daß MDA keine Hemmung der DBH bewirkte. Hierbei wurde eine MDA - Lösung derselben Konzentration verwendet wie bei der Injektion der Versuchstiere. $\frac{2{,}5\,\mu g}{\mu l}$

Tab. 3 Meßwerte zum Kontrollversuch der Inhibition der DBH durch MDA

DBH-Lsg [µl]	MDA-Lsg [µl]	cpm
2o	2o	6432
2o	-	661o
4o	4o	11126
4o	-	1o9o3
6o	6o	14454
6o	-	14791

Abb.6 Kontrollversuch zur Inhibition der DBH durch MDA

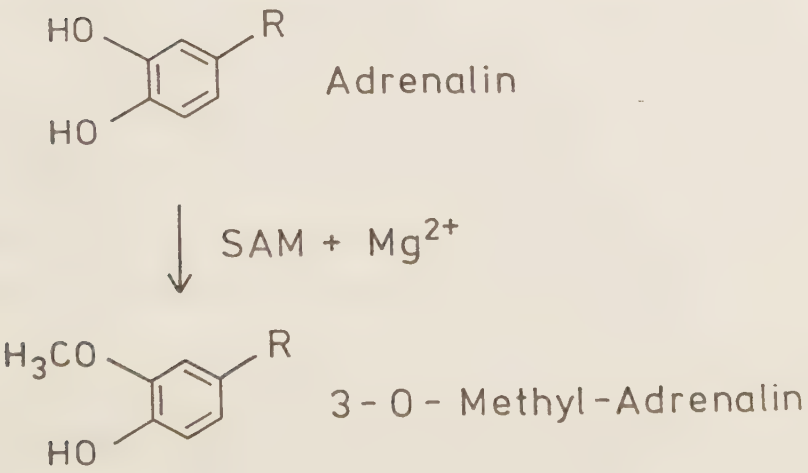


× Meßwerte mit MDA-Lsg.
○ Meßwerte ohne MDA-Lsg.

3.3.2 Messung der COMT - Aktivität modifiziert nach AXELROD [3]

Die enzymatische Aktivität der COMT wurde bestimmt durch die Umwandlung von $[^3H]$ - Adrenalin in $[^3H]$ -3-O- Methyl-Adrenalin (Metanephrine) unter Verbrauch von S-Adenosyl-Methionin (SAM) in Gegenwart von Mg^{2+}. Durch Extraktion mit Toluol und 3- Methyl - butan - 1 - ol (Isoamylalkohol) wurde $[^3H]$ - 3 - O - Methyl-Adrenalin isoliert und gemessen.

Abb. 7 Reaktion der COMT, die dem Aktivitätstest zugrunde liegt:



Verfahren:

Eine Reaktionsmischung wurde hergestellt aus:

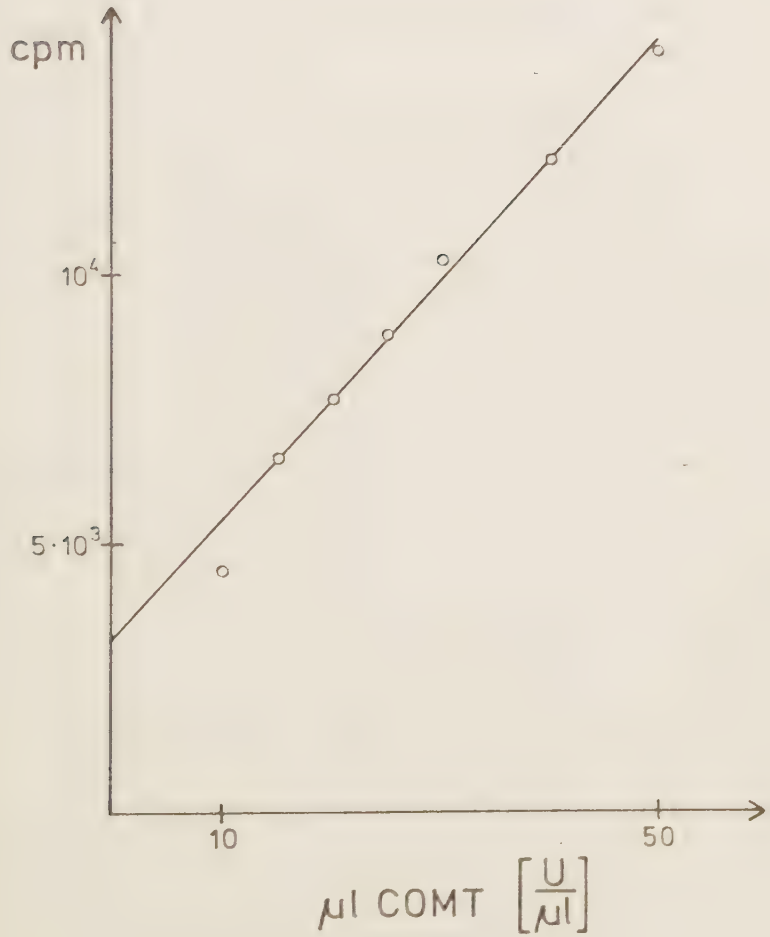
1o µl Adrenalin und [^{3}H] - Adrenalin
o,1 mol/l (22o ooo cpm)
25 µl Puffer B
25 µl Mg Cl_2 - Lösung (o,o2 mol/l)
2o µl SAM (1 mmol/l)
25 (bzw. 5o) µl Homogenat

und bei 37° C im Wasserbad 6o min lang inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit o,5 ml Puffer C wurden 5,o ml einer Mischung von Toluol und 3 - Methyl - butan - 1 - ol (3:2) hinzugefügt und das Gefäß für 15 min mechanisch geschwenkt. Darauf wurde die Probe 1o min bei 3ooo x g zentrifugiert, 3 ml Überstand entnommen und nach Zugabe von 1o ml Scintillationsflüssigkeit gemessen.

Zur Eichung des Aktivitätstests wurde COMT der Fa. SIGMA verwendet, wobei zur Aufstellung einer Eichkurve zwischen 1o und 6o µl, entsprechend 1o - 6o U eingesetzt wurden. Anhand der so ermittelten Eichkurve wurde die COMT - Aktivität der einzelnen Gewebeproben bestimmt. [s. Abb.8].

Nach Messung des Proteingehalts im Homogenat wurde die Aktivität in $\frac{\text{cpm}}{\text{mg Protein}}$ umgerechnet.

Abb. 8 Eichkurve der COMT-Aktivität



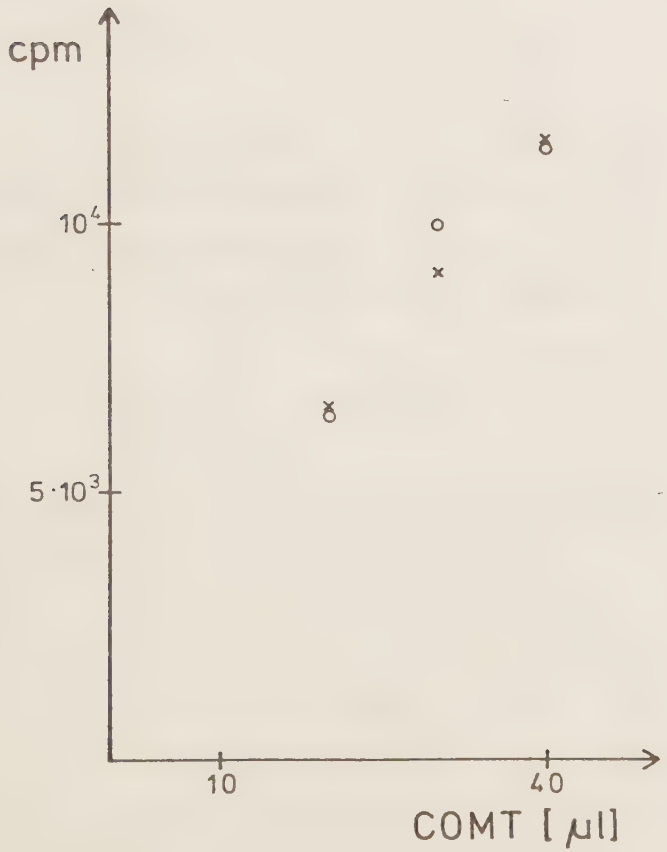
In einem Kontrollversuch konnte gezeigt werden, daß MDA in vergleichbarer Konzentration $\frac{2{,}5\,\mu g}{\mu l}$ keine direkte Hemmung der COMT bewirkte.

[Tab. 4, Abb. 9]

Tab. 4 Meßwerte zum Kontrollversuch [Abb.9]

COMT-Lsg [µl]	MDA-Lsg [µl]	cpm
2o	2o	6588
2o	-	6393
3o	3o	9102
3o	-	998o
4o	4o	11539
4o	-	11418

Abb.9 Kontrollversuch zur Inhibition der COMT durch MDA



× Meßwerte mit MDA-Lsg.
○ Meßwerte ohne MDA-Lsg.

4. Resultate

Die Meßwerte der Enzymaktivität beziehen sich auf den Proteingehalt im jeweiligen Ansatz und sind in

$$\frac{\text{cpm}}{\text{mg Protein}}$$

angegeben.

Da lediglich eine Beziehung der Aktivität der COMT, bzw. DBH, der mit MDA behandelten Versuchsgruppen und der Kontrollgruppen dargestellt werden sollte, wurde auf eine Umrechnung in Enzymaktivitäten verzichtet.

Die Bestimmung der Enzymaktivität beinhaltet folgenden geschätzten systematischen Fehler:

Gerätefehler (Zähler)	5 %
additiver Pipettierfehler	5 %
insgesamt	1o %

Der gültige Streuungsbereich wurde mit den Meßwerten für 25 µl und 5o µl Homogenat pro VT anhand folgender Formeln bestimmt:

$$Y = ax + b$$

$$\frac{\partial y}{y} = a \Delta x$$

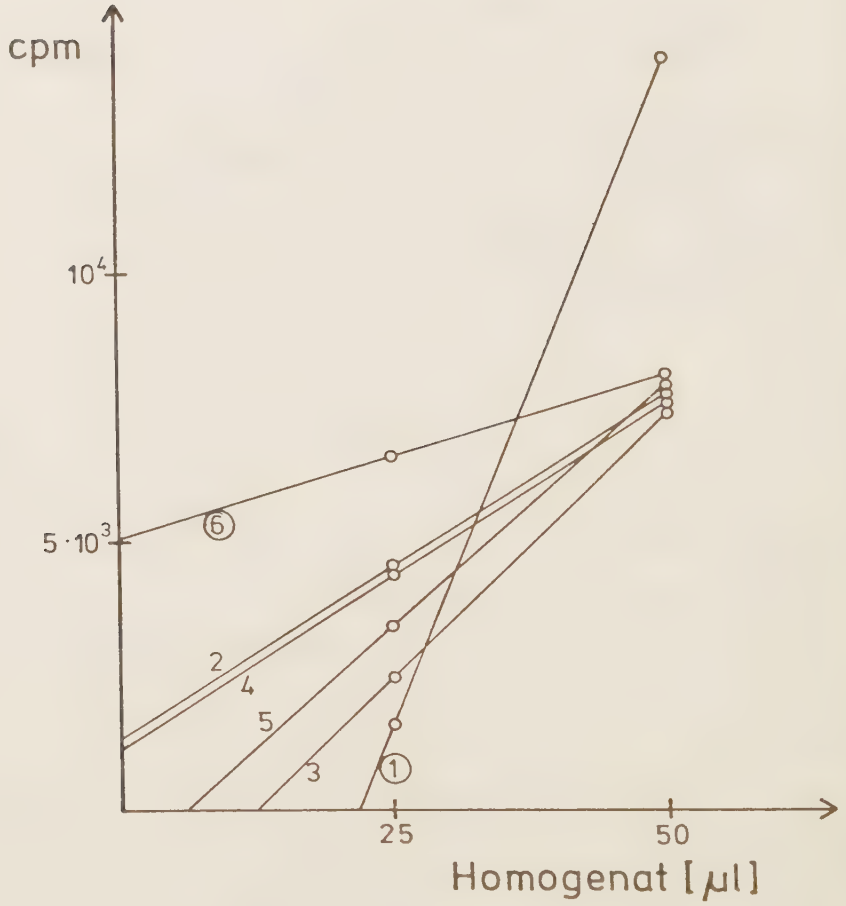
$$x = o{,}6 \quad 1$$

x = o,6 µl (= vom Hersteller angegebener Pipettierfehler bei 25 µl Gesamtvolumen und stark benetzender Flüssigkeit).

Werte, die sich außerhalb des Streuungsbereichs befinden, sind als Meßfehler anzusehen. Die entsprechenden Werte konnten bei der Darstellung und Auswertung der Ergebnisse nicht berücksichtigt werden und wurden in der tabellarischen Zusammenstellung entsprechend gekennzeichnet [*] .

Graphische Darstellung des Streuungsbereiches [s. Abb. 1o] , als Beispiel wurde Gruppe 4 der DBH - Aktivitätsbestimmung gewählt. Die Meßwerte 1 und 6 entfallen.

Abb.10 Graphische Darstellung des Streuungsbereichs; Beispiel: Gr.4; DB



Werte ① u. ⑥ entfallen

4.1 Tabellarische Zusammenstellung der Meßergebnisse

Tab. 5 bis Tab. 14

(Seite 4o - 49)

Gruppe I, unbehandelte Versuchstiere (Kontrolle)

Tab. 5

V.T. Nr.	Hirn-gewicht [g]	Puffer A [ml]	Prot. mg/ml	Proben-Vol. [µl]	DBH - Aktivitätsbestimmung				COMT - Aktivitätsbestimmung			
					cpm gem.	Δ cpm	Δcpm / 25 µl	Δcpm / mg Prot.	cpm gem.	Δcpm	Δcpm / 25 µl	Δcpm / mg Prot
1	o,5	3,o	1o,79	25	9922	6776	6745	25oo4	3314	119o	1295	48oo
				5o	166o5	13459			4818	2694		
2	o,5	3,o	1o,79	25	13o36	989o	7243	2685o*	3425	13o1	1363	5o52
				5o	14985	11839			4912	2788		
3	o,53	3,o	11,34	25	1o735	7589	7477	26373	3948	1824	1789	631o
				5o	17989	14843			5658	3534		
4	o,52	3,o	11,15	25	85o3	5357	5511	1977o	3234	111o	1158	4154
				5o	14323	11177			4488	2364		
5	o,52	3,o	11,15	25	6739	3593	4669	16749	3336	1212	1338	48oo
				5o	13560	1o414			4926	28o2		
6	o,53	3,o	11,34	25	1o372	7226	7226	25488	3594	147o	17o4	6o1o
				5o	-	-			5767	3643		

Tab. 6

V.T. Nr.	Hirn-gewicht [g]	Puffer A [ml]	Prot. mg/ml	Proben-Vol. [µl]	DBH - Aktivitätsbestimmung				COMT - Aktivitätsbestimmung			
					cpm gem.	Δcpm	Δcpm / 25 µl	Δcpm / mg Prot.	cpm gem.	Δcpm	Δcpm / 25 µl	Δcpm / mg Pro
1	o,53	4,3	8,28	25	9o39	5893	4963	23975	4341	2217	1877	9o67
				5o	12143	8997			5538	3414		
2	o,5o	3,o	1o.79	25	7752	46o6	4957	18376	5225	31o1	2659	9857
				5o	13411	1o265			7oo1	4877		
3	o,44	4,1	7,32	25	63o5	3159	3962	2165o	5229	31o5	2335	12759
				5o	11873	8727			6o24	39oo		
4	o,52	3,1	1o,85	25	7634	4488	542o	19981	4386	2262	1954	72o3
				5o	14918	11772			5723	3599		
5	o,57	3,o	12,o5	25	8517	5371	5173	17171	53o8	3184	2718	9o22
				5o	13293	1o147			7o93	4969		
[illegible]	o,54	3,o	11,52	25	11542	8396	7o97	24642	5o45	2921	2756	9569
				5o	16o42	12896			7471	5347		

* Wert entfällt

Gruppe III, unbehandelte Versuchstiere (Kontrolle)

Tab. 7

V.T. Nr.	Hirn-gewicht [g]	Puffer A [ml]	Prot. mg/ml	Proben-Vol. [µl]	DBH - Aktivitätsbestimmung				COMT - Aktivitätsbestimmung			
					cpm gem.	Δ cpm	Δcpm / 25 µl	Δcpm / mg Prot.	cpm gem.	Δ cpm	Δcpm / 25 µl	Δcpm / mg Prot
1	o,47	3,1	9.94	25	5369	2223	3297	13267	3579	1455	1382	5561
				5o	1o815	7669			4814	269o		
2	o,51	3,o	1o,97	25	5215	2o69	4o85	14895	3496	1372	1242	4528
				5o	13333	1o187			4478	2354		
3	o,47	3,o	1o,23	25	7696	445o	3613	14127*	2511	387	443	1732*
				5o	9534	6388			3o66	942		
4	o,46	3,o	1o,o4	25	5634	2488	2881	11478	2921	797	1118	4454
				5o	93o2	6156			468o	2556		
5	o,49	3,o	1o,6o	25	7774	4628	46o3	17369	3o75	951	1o56	3984
				5o	12326	918o			4342	2218		
6	o,47	3,o	1o,23	25	5319	2173	3319	12977	3418	1294	12o1	4695
				5o	1o93o	7784			4433	23o9		

Tab. 8

V.T. Nr.	Hirn-gewicht [g]	Puffer A [ml]	Prot. mg/ml	Proben-Vol. [µl]	DBH - Aktivitätsbestimmung				COMT - Aktivitätsbestimmung			
					cpm gem.	Δcpm	Δcpm / 25 µl	Δcpm / mg Prot.	cpm gem.	Δcpm	Δcpm / 25 µl	Δcpm / mg Prot
1	o,48	3,o	1o,41	25	7555	44o9	5287	2o315	3765	1641	1647	6328
				5o	14599	11453			5424	33oo		
2	o,48	3,o	1o,41	25	794o	4794	49o3	18839	31o3	979	1134	4357
				5o	13o61	9915			4548	2424		
3	o,48	3,o	1o,41	25	6678	3532	3969	15250	4o69	1945	1499	5759
				5o	11522	8376			4677	2553		
4	o,5o	3,o	1o,79	25	4495	1349	3152	11684	3679	1555	1533	5683
				5o	11254	81o8			5169	3o45		
5	o,48	3,o	1o,41	25	7661	4515	4418	16975	4662	2538	2155	828o
				5o	11885	8739			6o5o	3926		
6	o,51	3.o	1o,97	25	6o37	2891	4o96	14935	3o58	934	81o	2953
				5o	12542	9396			3619	1495		

* Wert entfällt

Gruppe 1, behandelte Versuchstiere — 12 Std. nach Erstinjektion

Tab. 9

V.T. Nr.	Hirngewicht [g]	Puffer A [ml]	Prot. mg/ml	Proben-Vol. [µl]	DBH - Aktivitätsbestimmung: cpm gem.	Δcpm	Δcpm / 25 µl	Δcpm / mg Prot.	COMT - Aktivitätsbestimmung: cpm gem.	Δcpm	Δcpm / 25 µl	Δcpm / mg Prot.
1	o,48	3,7	8,67	25	7932	4786	4857	22408	4176	2052	2184	10076
				50	12932	9786			6624	4500		
2	o,46	3,o	1o,o3	25	851o	5364	4330	17268	3135	1011	1337	5332
				50	10773	7627			5125	3001		
3	o,49	3,4	9,51	25	8376	5230	5563	23398	3333	1209	1203	5059
				50	14606	11460			4524	2400		
4	o,47	3,o	1o,23	25	7291	4145	2854	11159 *	3887	1763	1617	6322
				50	7562	4416			5212	3088		
5	o,46	3,o	1o,o3	25	5849	2703	5081	20263 *	3970	1846	1692	6747
				50	15685	12539			5353	3229		
6	o,48	3,7	8,67	25			4480	20669	3579	1455	1589	7331
				50	12106	8960			5437	3313		

* Wert entfällt

Tab. 1o

V.T. Nr.	Hirn-gewicht [g]	Puffer A [ml]	Prot. mg/ml	Proben-Vol. [µl]	DBH - Aktivitätsbestimmung cpm gem.	Δcpm	Δcpm / 25 µl	Δcpm / mg Prot.	COMT - Aktivitätsbestimmung cpm gem.	Δcpm	Δcpm / 25 µl	Δcpm / mg Pro
1	o,48	3,o	1o,41	25	6o7o	2924	293o	11258	4392	2268	2383	9156
				5o	9o11	5865			7oo5	4881		
2	o,47	3,o	1o,23	25	4645	1499	3934	15382	3597	1473	1223	4782
				5o	1345o	1o3o7			4321	2197		
3	o,48	3,o	1o,41	25	8629	5483	6598	25352	3o14	89o	975	3746
				5o	17457	14311			4159	2o35		
4	o,46	3,o	1o,o4	25	92o3	6o57	5499	219o8	3468	1344	1o66	4247
				5o	13587	1o441			3977	1853		
5	o,49	3,o	1o,6o	25	9246	61oo	5o16	18928	3251	1127	1114	42o3
				5o	12o93	8947			4339	2215		
	o,48	3,o	1o,41	25	6413	3267	5o2o	19289	38o6	1682	1838	7o62
				5o	1494o	11794			5956	3832		

* Wert entfällt

Gruppe 3, behandelte Versuchstiere 1o8 Std. nach Erstinjektion

Tab. 11

V.T. Nr.	Hirn-gewicht [g]	Puffer A [ml]	Prot. mg/ml	Proben-Vol. [µl]	DBH - Aktivitätsbestimmung				COMT - Aktivitätsbestimmung			
					cpm gem.	Δcpm	Δcpm / 25 µl	Δcpm / mg Prot.	cpm gem.	Δcpm	Δcpm / 25 µl	Δcpm / mg Prot
1	o,46	3,o	1o,o4	25	8349	52o3	648o	25816	3746	1622	1668	6645
				5o	17385	14239			55o7	3383		
2	o,48	3,1	1o,12	25	7427	4281	5111	2o2o1	3165	1o41	1165	46o8
				5o	14198	11o52			4581	2457		
3	o,45	3,2	9,31	25	545o	23o4	4262	18311	3191	1o67	988	4244
				5o	13627	1o481			4o21	1897		
4	o,46	3,o	1o,o4	25	4229	1o83	18o7	7199	4666	2542	2166	8629
				5o	7484	4338			6o8o	3956		
5	o,45	3,o	9,85	25	6768	3622	3274	13308	3469	1345	1451	5892
				5o	9346	62oo			5132	3oo8		
6	o,44	4,6	6,59	25	4856	171o	3665	22245	3121	997	833	5o56
				5o	12432	9286			3626	15o2		

Tab. 12

V.T. Nr.	Hirngewicht [g]	Puffer A [ml]	Prot. $\frac{mg}{ml}$	Proben-Vol. [µl]	DBH - Aktivitätsbestimmung				COMT - Aktivitätsbestimmung			
					cpm gem.	Δcpm	$\frac{\Delta cpm}{25\ \mu l}$	$\frac{\Delta cpm}{mg\ Prot.}$	cpm gem.	Δcpm	$\frac{\Delta cpm}{25\ \mu l}$	$\frac{\Delta cpm}{mg\ Prot}$
1	0,49	3,2	10,03	25	4696	1550	5181	20662 *	3235	1111	1209	4821
				50	17140	13994			4640	2516		
2	0,49	3,0	10,60	25	7640	4494	4058	15313	3420	1296	1307	4932
				50	10826	7680			4749	2625		
3	0,47	3,0	10,23	25	5579	2433	3273	12797	3672	1548	1582	6185
				50	10532	7386			5322	3198		
4	0,49	3,0	10,60	25	7532	4386	3963	14954	3592	1468	1520	5735
				50	10648	7502			5215	3091		
[illegible]	0,49	3,0	10,60	25	6549	3403	3732	14083	3293	1169	1293	4879
				50	10938	7792			4833	2709		
6	0,48	3,0	10,41	25	9681	6535	4843	18626 *	3843	1719	1778	6831
				50	11140	7994			5739	3615		

* Wert entfällt

Gruppe 5, behandelte Versuchstiere — 372 Std. nach Erstinjektion

Tab. 13

V.T. Nr.	Hirngewicht [g]	Puffer A [ml]	Prot. mg/ml	Proben-Vol. [µl]	DBH - Aktivitätsbestimmung: cpm gem.	Δcpm	Δcpm / 25 µl	Δcpm / mg Prot.	COMT - Aktivitätsbestimmung: cpm gem.	Δcpm	Δcpm / 25 µl	Δcpm / mg Prot
1	0,47	3,0	10,23	25	7814	4668	5482	21434	3816	1692	1556	6084
				50	14923	11777			5101	2977		
2	0,45	3,0	9,85	25	6748	3602	4988	20255	3789	1665	1611	6542
				50	14508	11362			5291	3167		
3	0,46	3,0	10,04	25	7187	4041	4208	16764	4032	1908	1819	7247
				50	11728	8582			5672	3548		
4	0,46	3,0	10,04	25	7811	4665	4639	18482	2141	17	1093	4354
				50	12397	9251			5384	3260		
5	0,47	3,0	10,23	25	6525	3379	2944	11511	2257	133	1213	4742
				50	8600	5454			5629	3505		
6	0,42	3,0	9,27	25	5475	2329	3272	14118	2355	231	1703	7348
				50	10632	7486			7003	4879		

* Wert entfällt

Tab. 14

V.T. Nr.	Hirngewicht [g]	Puffer A [ml]	Prot. mg/ml	Proben-Vol. [µl]	DBH - Aktivitätsbestimmung				COMT - Aktivitätsbestimmung			
					cpm gem.	Δcpm	Δcpm / 25 µl	Δcpm / mg Prot.	cpm gem.	Δcpm	Δcpm / 25 µl	Δcpm / mg Prot
1	o,51	3,o	1o,97	25	8988	5842	8263	3o129	367o	1546	1395	5o86
				5o	22o93	18947			4762	2636		
2	o,47	3,o	1o,23	25	13936	1o79o	92o6	35996	3123	999	1327	5188
				5o	19975	16829			51o5	2981		
3	o,49	3,o	1o,6o	25	13198	1oo52	924o	34867	3628	15o4	1278	4822
				5o	2o813	17667			4453	2329		
4	o,48	3,o	1o,41	25	14444	11298	89o1	342o1	4169	2o45	131o	5o33
				5o	18851	154o5			4oo8	1884		
5	o,51	3,o	1o,97	25	1243o	9284	9574	349o9	3919	1795	194o	7o73
				5o	22583	19437			6151	4o27		
	o,48	3,o	1o,41	25	12932	9786	9611	36929	3846	1722	1877	7212
				5o	22194	19o48			6o32	39o8		

* Wert entfällt

4.2 Auswertung der Meßergebnisse

4.2.1 DBH - Aktivität

Um die Ergebnisse bei kleinerer Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe (n = 6) vergleichen zu können, wurden alle Werte auf die Varianz s^2 und die Standardabweichung s hin untersucht, und zwar nach der Formel:

$$s^2 = \frac{\sum_{1}^{n} \left(\bar{x} - x_i \right)^2}{n - 1}$$

$$s = \pm \sqrt{s^2}$$

Für die Aktivität der DBH findet sich innerhalb der Gruppen 1 - 5 eine geringe Streuung im Vergleich zu der Kontrollgruppe unbehandelter Versuchstiere, jedoch keine deutliche Änderung der Enzymaktivität.

Wird der Mittelwert $\bar{x}$ der Kontrollgruppe unbehandelter Versuchstiere gleich 1oo % gesetzt, so ergeben sich für die behandelten Versuchstiere in Gr. 1 - Gr. 6 folgende Werte:

Gruppe	cpm	= % Abweichung v.d. Kontrolle
$\bar{x}$ Kontrolle	185o7	-
$\bar{x}$ Gr. 1	2o936	+ 13 %
$\bar{x}$ Gr. 2	18686	+ 1 %
$\bar{x}$ Gr. 3	17847	- 4 %
$\bar{x}$ Gr. 4	14286	- 23 %
$\bar{x}$ Gr. 5	17o94	- 8 %
$\bar{x}$ Gr. 6	345o5	+ 86 %

Eine eindeutige Änderung der Aktivität der DBH ist in Gr. 6 deutlich erkennbar, und zwar um + 86 %.

DBH - Aktivitätsmessungen

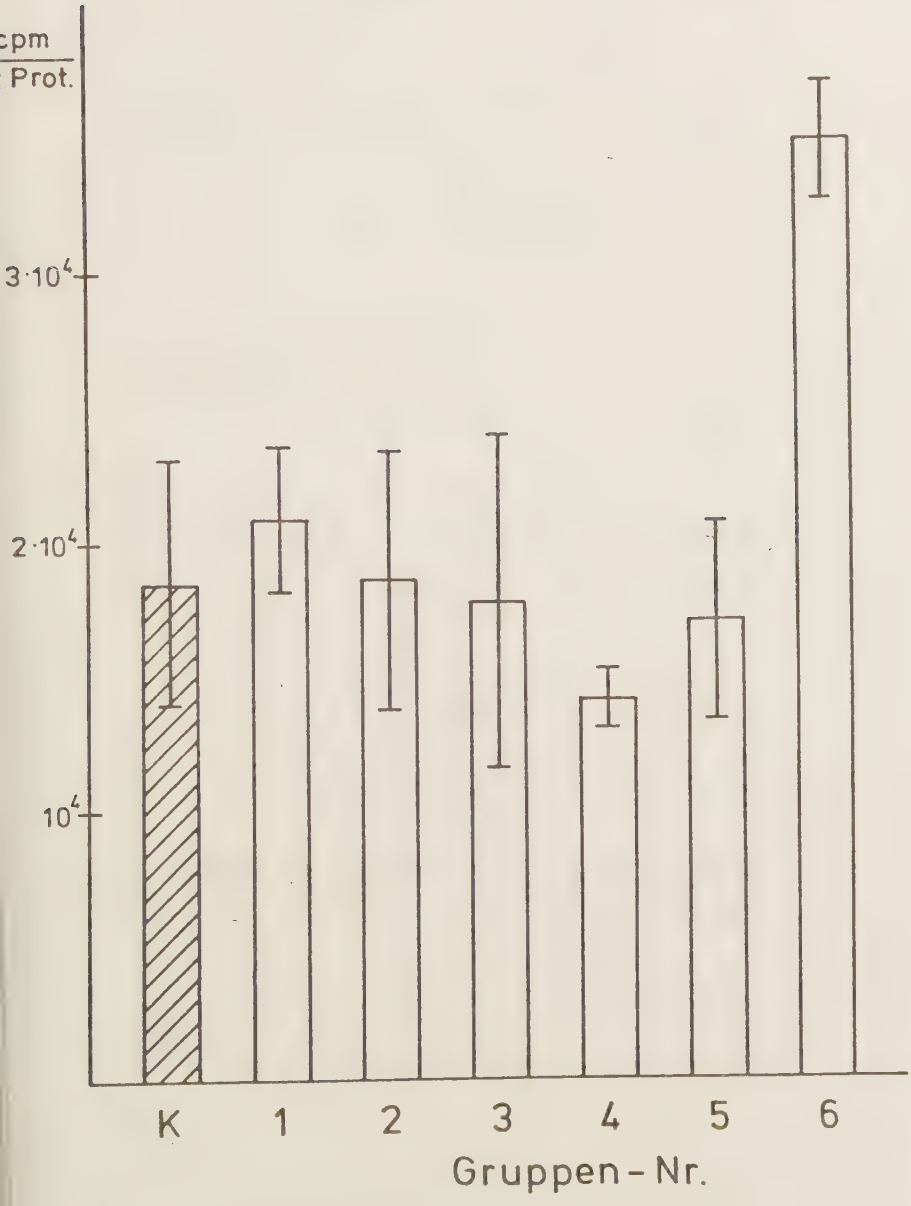
Tab. 15: Zusammenstellung von Mittelwert $\bar{x}$
Standardabweichung s
Variationsbreite R

errechnet nach der Formel:

$$\text{Varianz} = s^2 = \frac{\sum_{1}^{n} \left(\bar{x} - x_i\right)^2}{n - 1}$$

Gruppe	$\bar{x}$	s	R
1	20936	2692	6130
2	18686	4925	14094
3	17847	5225	12508
4	14286	1118	2516
5	17094	3765	9923
6	34505	2350	6800
Kontrolle	18507	4557	14895

Abb.11 DBH Aktivitätsänderung $\frac{\text{cpm}}{\text{mg Protein}}$



▨ Kontrollgruppe

4.2.2 COMT - Aktivität

Für die Auswertung der Meßergebnisse wurde hier dasselbe Verfahren wie in 4.2.1 angewendet.

Wird der Mittelwert ($\bar{x}$) der Kontrollgruppe unbehandelter Versuchstiere gleich 1oo % gesetzt, so zeigt sich folgende Verteilung für die Gruppen 1 - 6 behandelter Versuchstiere:

Gruppe	cpm	% Abweichung v.d. Kontrolle
$\bar{x}$ Kontrolle	5995	-
$\bar{x}$ Gr. 1	6811	+ 14 %
$\bar{x}$ Gr. 2	4948	- 17 %
$\bar{x}$ Gr. 3	5846	- 2 %
$\bar{x}$ Gr. 4	5564	- 7 %
$\bar{x}$ Gr. 5	5793	- 3 %
$\bar{x}$ Gr. 6	5876	- 2 %

Daraus folgt, daß die Aktivität der COMT im experimentellen Ablauf nahezu unverändert geblieben ist.

COMT - Aktivitätsmessungen

Tab. 16: Zusammenstellung von

Mittelwert $\bar{x}$

Standardabweichung s

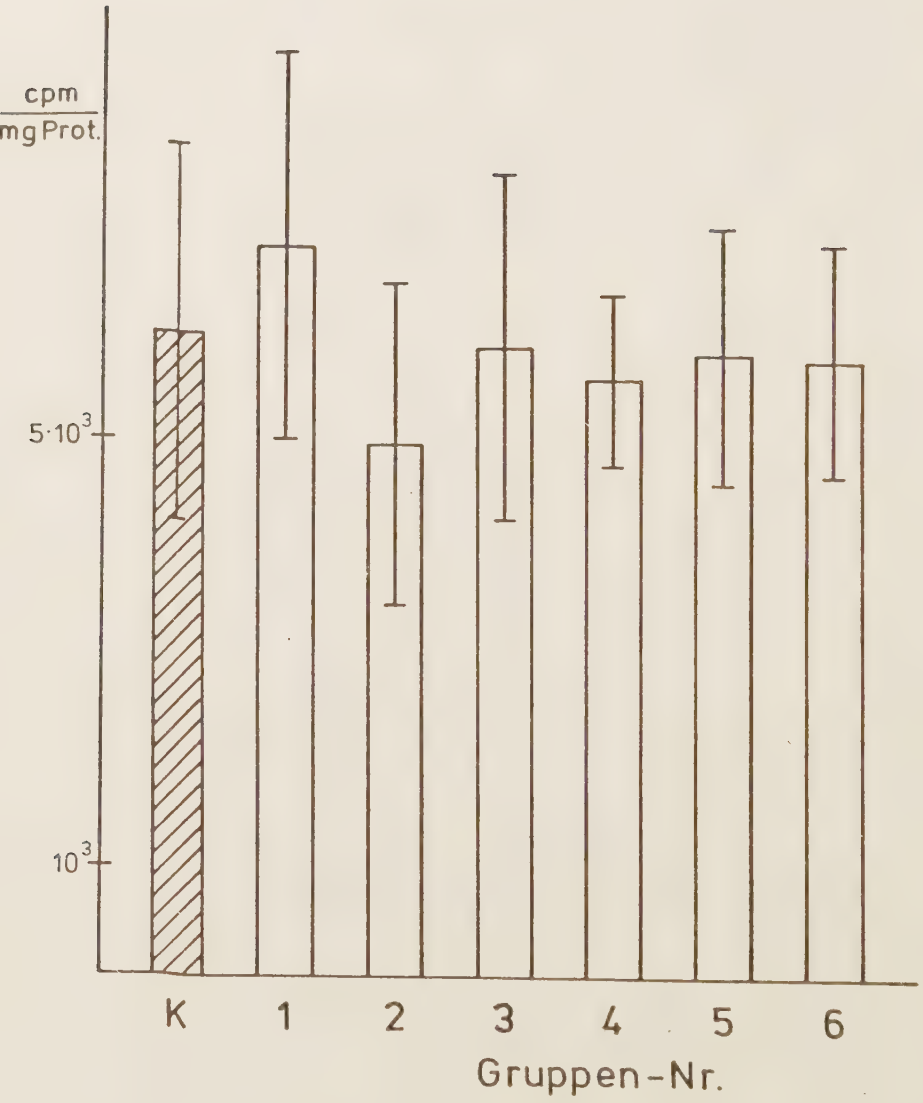
Variationsbreite R

errechnet nach der Formel:

$$\text{Varianz} = s^2 = \frac{\sum_{1}^{n}\left(\bar{x} - x_i\right)^2}{n - 1}$$

Gruppe	$\bar{x}$	s	R
1	6811	1812	5017
2	4948	1471	3316
3	5846	1619	4385
4	5564	829	2010
5	5793	1218	2893
6	5876	1097	2390
Kontrolle	5995	1789	5873

Abb. 12 COMT-Aktivitätsänderung $\frac{\text{cpm}}{\text{mg Protein}}$



▨ Kontrollgruppe

5. Diskussion

Die vorliegende Untersuchung diente dazu, den Einfluß von Methylendioxyamphetamin, MDA, auf die Aktivität zweier am Catecholamin - Metabolismus beteiligter Enzyme, der Catechol - O - Methyl - Transferase und der Dopamin - ß - Hydroxylase, zu untersuchen. Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Catecholamin - Biosynthese, die Tyrosin -3'- Hydroxylase, konnte aus methodischen Gründen nicht mitbestimmt werden.

Untersuchung der Catechol - O - Methyl - Transferase

Nach den Untersuchungen von MARQUARDT et al wirkt MDA wahrscheinlich über eine vermehrte Ausschüttung des Transmitters Noradrenalin [17]. Darauf basierend wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, die vermehrte Ausschüttung dieses Transmitters, und damit die höhere Konzentration im synaptischen Spalt, könne zu einer Aktivitätssteigerung des inaktivierenden Enzyms Catechol - O - Methyl - Transferase führen. In den hier dargestellten Untersuchungen konnte eine derartige Aktivitätssteigerung nicht nachgewiesen werden. Die Aktivität der Catechol - O - Methyl - Transferase blieb während des gesamten chronischen Experiments innerhalb der Fehlergrenzen konstant und änderte sich auch nicht nach einer Erholungsphase von einer Woche.

Daraus folgt, daß die erhöhte Noradrenalin-Ausschüttung (s. MARQUARDT [17]) unter den gewählten Bedingungen nicht zu einer Induktion zusätzlicher COMT - Aktivität führt. In einem Kontrollexperiment konnte eine direkte Inhibition der COMT durch Methylendioxyamphetamin ausgeschlossen werden

Untersuchung der Dopamin - ß - Hydroxylase

Von GOLDSTEIN und CONTRERA wurde postuliert, daß die Dopamin - ß - Hydroxylase durch MDA inhibiert würde. Nach THIESSEN und COOK sollte diese postulierte Inhibition jedoch nicht an den unmittelbaren Wirkungen von MDA beteiligt sein. In der vorliegenden Untersuchung wurde nachgewiesen, daß MDA keine Änderung der DBH - Aktivität bewirkt. Ebenfalls konnte ausgeschlossen werden, daß MDA eine direkte Inhibition der DBH verursacht. Gegenüber der Kontrollgruppe zeigten sich während des chronischen Experiments Abweichungen der Mittelwerte der mit MDA behandelten Gruppen von + 13 % bis - 22 %. Diese Abweichungen liegen innerhalb der Fehlerbreite des Experiments. Interessanterweise zeigte sich, daß nach einer Erholungspause von einer Woche jedoch die Aktivität der DBH gegenüber der Kontrollgruppe um 86 % anstieg. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens ist darin zu sehen,daß während des chronischen Experimentes die DBH über einen indirekten Mechanismus inhibiert wurde, was sich in den vorliegenden Meßergebnissen zwar nicht reflektiert, aber denkbar wäre, wenn die Inhibition proportional durch Neusynthese des Enzyms kompensiert worden wäre. Der Wert nach einer Woche Erholungszeit könnte die durch die Inhibition bedingte Neusynthese reflektieren und den sehr hohen Wert von 86 % über Kontrolle verständlich machen.
In diesem Falle wäre eine Bestimmung der beteiligten Transmittersysteme wünschenswert, konnte jedoch aufgrund fehlender technischer Möglichkeiten nicht durchgeführt werden.

Zusammenfassend darf gesagt werden, daß im vorliegenden Experiment keine Beeinflussung der Catechol - O - Methyl - Transferase durch MDA gezeigt werden konnte. Hingegen sind

die Änderungen der DBH - Aktivität nach einer Woche Ruhephase im Einklang mit den Untersuchungen von MARQUARDT et al. zu sehen, die eine noradrenerge Komponente der Methylendioxyamphetamin - Wirkung annehmen.

Künftige Untersuchungen sollten ihr Augenmerk ferner auf den Hauptmetaboliten von MDA, α - Methyldopamin, richten, und dessen Einfluß auf die neuronalen Transmittersysteme aufklären.

6. Zusammenfassung

1. Es wurde die Aktivität der Dopamin - ß - Hydroxylase und der Catechol - O - Methyl - Transferase unter Einfluß von Methylendioxyamphetamin an Mäusehirnen gemessen.

2. Bei der Ermittlung einer MDA - Dosis für das chronische Experiment zeigte sich, daß bei einer Dosis von 2o - 7o mg/kg KG die 24 - Std - Toxizität höher lag als die akute 4 - Std - Toxizität.

3. Es gibt 2 Gipfel bei der Häufigkeitsverteilung der Mortalität von MDA, ein Gipfel findet sich bei 33 mg/kg, ein weiterer bei Dosen über 7o mg/kg.

4. Die Aktivität der COMT blieb unter dem Einfluß von MDA unverändert und zeigte auch nach einer Erholungsphase von einer Woche keinen An- oder Abstieg.

5. Die DBH - Aktivität ließ im Vergleich mit der Kontrollgruppe unter Einwirkung von MDA nur geringe Schwankungen erkennen,stieg jedoch nach der Erholungsphase um 86 % an.

7. Literatur

1. ALLES, G.;: In : RICHARDS, R.N.; Experience with MDA, Canadian Medical Association J. 1o6 (3): 256, 258 - 59; 2 (1972).

2. ANDERSON, G.M.; BRAUN,G.; BRAUN, U.; NICHOLS, D.; SHULGIN, A.T.;: Absolute configuration and psychotomimetic activity; NIDA, Research Monograph series; (1978), 22, 8 - 15 Rockville, Md.

3. AXELROD, J.: Catechol - O - Methyl - Transferase from Rat Liver;: In: COLOWICK, S.; KAPLAN, N.; (Ed.):. Methods in Enzymology V, 748 - 51 (1o1 b), (1962).

4. BAKER, S.P.; HEMSWORTH, B.A.: The effects of Amphetamine and a related compound on MAO; Naunyn - Schmiedberg's Archives of Pharmacology 279 (Suppl.) R 24 (1973) .

5. BEISENHERZ, G.; BOLTZE, H.-J.; BÜCHER, Th.; CZOK, R.; GARBADE, K.H.; MEYER - ARENDT, E.; PFLEIDERER, G.: Z. Naturforsch, 8b, 555 (1953).

6. DALY, J.W.; CREVELING, C.R.; WITKOP, B.: The chemorelease of Norepinephrine from Mouse Hearts. Structure Activity Relationships. I. Sympathomimetic and Related Amines; J.Med. Chem. 9, 273 (1966).

7. FELLOWS, E.J.; BERNHEIM, F.;: Effect of a number of aryl alkylamines on the oxidation of tyramine by amine oxidase. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1oo, 94 (195o).

8. FINKLE, B.S.;: In : Student Association for the Study of Hallucinogens, Inc., MDA: A Different Psychedelic, Nat.Inst. of Mental Health (1974).

9. GOLDSTEIN, M.; CONTRERA, J.F.;: Inhibition of 3,4 - dihydroxy - phenyl - ethylamine (dopamine)- ß - oxidase in vitro; Experientia, 17, 267 (1961).

1o. GUNN, J.A.; In : THIESSEN, P.N.; COOK, D.A.; The Properties of MDA; I. A Review in Literature, Clin. Tox. 6 (I), 45 - 52 (1973).

11. JACKSON, B.; REED, A.;: Another Abusable Amphetamine; JAMA, Vol 211, No 5, Feb. (197o).

12. JATZKEWITZ, H.;: Neurochemie, Einführung,Stuttgart, Thieme (1978)

13. JOH, T.H.; ROSS, R.A.; REIS, D.J.: A simple and sensitive assay for Dopamine - ß - Hydroxylase, Analyt. Biochem. 62, 248 - 54 (1974).

14. LUKASZEWSKI, T.: 3,4 Methylendioxyamphetamin - overdose; Clin. Tox. 15 (4), 4o5 - 9 (1979).

15. MANN, P.J.G.; QUASTEL, J.H.: Benzedrine (ß - Phenyl-isopropylamine) and Brain Metabolism. Biochemical J. 34, 414 - 431 (194o).

16. MANNICH, C.; JACOBSOHN, W.: In: THIESSEN/COOK: The Properties of MDA; I. A Review in Literature, Clin. Tox. 6 (I), 45 - 52 (1973).

17. MARQUARDT, G.M.; DISTEFANO, V.; LING, L.L.:Effects of Racemic, (S) - and (R) - MDA on synaptosomal Uptake and Release of tritiated Norepinephrine; Biochem. Pharmac. 27, 1497 - 15o1 (1977).

18. MARQUARDT, G.M.; DISTEFANO, V.; LING, L.L.: Metabolism of 3,4-methylene - dioxyamphetamine in the rat. Biochem. Pharmac. 27, 15o3 - o5 (1977).

19. MEYERS, F.H.;: In: Student Association for the Study of Hallucinogens, Inc.; MDA : A Different Psychedelic; Nat.Inst. of Mental Health (1974).

2o. NARANJO, C.; SHULGIN, A.T.; SARGENT, T.: Evaluation of 3,4-Methylenedioxyamphetamine as an Adjunct to Psychotherapy; Med. Pharmacol. exp. 17, 359 - 64 (1967).

21. NICHOLS, D.E.; ILHAN, M.; LONG, J.P. (1974): In: ANDERSON, M.; BRAUN, G.; BRAUN, U.; NICHOLS,D.E.; SHULGIN, A.T.: Absolute Configuration and Psychomimetic Activity, NIDA, Res. Mon. series, 22, 8-15 (1978).

22. NICHOLS, D.E.; SHULGIN, A.T.; DYER, D.C.: Directional Lipophilic character in a series of Psychotomimetic Phenethylamine Derivates, Life Sci, 21, 569 - 76 (1977).

23. PATON, D.M.; BELL, J.I.; YEE, R.; COOK, D.A.: Proc. West. Pharmacol. Soc. 18, 229 (1975).

24. RAHMANN, H.: Neurobiologie, Ulmer Verl., Stuttgart, (1976).

25. REED, D.; GRAVEY, R.H.; SEDGWICK, P. : A Fatal CASE Involving Methylenedioxyamphetamine, Clin. Tox. 5 (I); 3 - 6 (1972).

26. RICHARDS, K.C.; BORGSTEDT, H.H.: Near fatal Reaction to Ingestion of the Hallucinogenic Drug MDA, JAMA, Vol. 218 (12) Dez. (1971).

27. RICHARDS, R.N.: Experience with MDA, Canadian Med. Ass. J. 106 (3): 256, 258 - 59, 2 (1972).

28. SHANNON, H.E.: MDA and DOM: Substituted Amphetamines that do not produce Amphetamine - Like Discriminative Stimuli in the Rat, Psychopharmacology 67, 311 - 12 (198o).

29. STUDENT Ass. for the Study of Hallucinogens, Inc.: MDA: A Different Psychedelic, Nat. Inst. of Mental Health (1974).

30. THIESSEN, P.N.; COOK, D.A.: The Properties of MDA I. A Review of the Literature, Clin. Tox. 6 (I), 45 - 52 (1973).

31. THIESSEN, P.N.; COOK, D.A.: The Properties of MDA II. Studies of Acute Toxicity in the mouse and Protection by various Agents, Clin. Tox. 6 (2) 193 - 199 (1973).

32. TUREK, J.S.; SOSKIN, R.A.; KURLAND, A.A.: Methylenedioxyamphetamine; subjective effects. J. Psychedelic Drugs 6, 7 (1974).

33. VAN DER SCHOOT, J.B.; ARIENS, E.J.; ROSSUM, J.M.: Phenylisopropylamine Derivatives, Structure and Action Arzneimittel - Forschg. 12, 902 (1962).

Mein herzlicher Dank gilt allen, die mir bei der Fertigstellung dieser Arbeit oft geduldig zur Seite standen.

Ganz besonders danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. M. Binder für seine wertvollen Ratschläge und für seine engagierte und verständnisvolle Betreuung.

Herrn Prof. Dr. A.W. Holldorf möchte ich für seine stete Bereitschaft zur Diskussion danken, sowie für seine Ermutigung, über die Enzymologie hinaus auch andere Aspekte der Medizin nicht aus den Augen zu verlieren.

Herrn Dr. R. Wittig sage ich meinen herzlichen Dank für seine hilfreichen Anregungen bei der mathematischen Auswertung, Herrn R. Pamp für seine vielseitige Unterstützung bei der technischen Durchführung dieser Arbeit.

Tabellarischer Lebenslauf

08.09. 1952	geboren als zweites Kind des Tierarztes Wilhelm Lübs und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Wiedemann, in Osterwieck/Harz
1958 - 1966	ev. Grundschule und Realschule in Berge
1966 - 1971	Artland - Gymnasium - Quakenbrück
1971	Abitur (neusprachl. Zweig)
1971 - 1973	Grundstudium Biologie an der Universität zu Köln
1971 - 1975	Sportstudium an der Deutschen Sporthochschule Köln
1973 - 1977	Erteilung nebenamtlichen Unterrichts an Kölner Schulen
1977 - 1978	Studium der Medizin (Vorklinik) Ruhr - Universität Bochum
1978	Ärztliche Vorprüfung
1978 - 1979	1. klin. Abschnitt Universität Essen
1979 - 1982	2. u. 3. klin. Abschnitt Ruhr - Universität Bochum
1980	1. Abschnitt der Ärztl. Prüfung
1981	2. Abschnitt der Ärztl. Prüfung
1982	3. Abschnitt der Ärztl. Prüfung
1982	Approbation als Ärztin

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353